

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 34 630 A 1

⑳ Aktenzeichen: 195 34 630.0
㉑ Anmeldetag: 18. 9. 95
㉒ Offenlegungstag: 20. 3. 97

⑤ Int. Cl. 6:
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395
C 12 N 15/06
C 12 P 21/08
C 12 N 5/16
G 01 N 33/574
// C12N 5/18

㉑ Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

㉒ Erfinder:
Kersten, Uwe, Dr., 10407 Berlin, DE; Cao, Yi, 13125
Berlin, DE; Haase, Margit, 13125 Berlin, DE; Kiefer,
Margot, 16341 Schwanebeck, DE; Fecher, Gabriele,
Dr., 13125 Berlin, DE

⑤ Monoklonale Antikörper gegen epitheliales Mucin (MUC1)

⑤ Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen epitheliales Mucin (MUC1), ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zum immunhistologischen und immunologischen Tumornachweis. Die neuen Antikörper haben eine ungewöhnliche Spezifität und eine hohe Avidität. Eine Besonderheit besteht darin, daß gleichzeitig spezifische Antikörper der Klassen G1 und M gebildet werden. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die Immuntherapie und die pharmazeutische Industrie.

DE 195 34 630 A 1

195 34 630 A 1

BEST AVAILABLE COPY
ED

Beschreibung

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das menschliche epitheliale Mucin MUC1 (synonym mit PEM, PUM, MAM-6, EMA, PAS-O und Episialin), ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zum immunhistologischen und immunologischen Tumornachweis.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die Immuntherapie und die pharmazeutische Industrie.

Die Muzine sind in normalen Epithelien Gesunder in charakteristischer Weise verbreitet (Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J.: Mucins. In: Kreis, T. Vale, R. (eds.), Guidebook to the Extracellular matrix and Adhesion Proteins, Oxford 1993). Das bekannteste Mucin ist MUC1, ein hochmolekulares ($M_r > 5 \times 10^5$) Membranglykoprotein, das aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Abschnitte von 20 Aminosäuren besteht, den sogenannten "Tandem-Repeats". Die Eignung des MUC1-Moleküls als Tumoranigen beruht darauf, daß seine Expression bei Tumorpacienten (bevorzugt bei Mammakarzinom und bei gastrointestinalen Tumoren) in der Regel modifiziert ist:

- Auf Tumorzellen Verlust der polaren Expression.
- Verstärkte Expression in Tumorzellen, auch intrazellulär.
- Die Glykosylierung der Muzine ist in Tumoren gestört.
- MUC1 tritt im Serum Tumorkranker auf.
- MUC1 tritt ektopisch auf (z. B. auf kolorektalen Karzinomen, während es auf normaler Darm-schleimhaut fehlt).

Jede dieser Veränderungen kann Grundlage eines Tumortests sein, erfordert aber ein anderes methodisches Herangehen.

Es gibt bereits Tumortests, die monoklonale Antikörper (mAk) gegen MUC1 als Komponenten enthalten. Die bisher beschriebenen mAk wurden durch Immunisierung von Versuchstieren mit mehr oder weniger gereinigten Mucinpräparaten oder mit Peptiden hergestellt. Sie erkennen MUC1-Epitope, die sich eng um eine bestimmte Aminosäuresequenz des MUC1-Tandem-Repeats gruppieren (Taylor-Papadimitriou, J., Lalani, E.-N., Burchell, J., Gendler, S.J. Mucin antigens: Molecular structure and potential use in immuno-therapy. J. Nucl. Med. Allied Sci. 34 (Suppl. to No. 3): 144-150 (1990)). Dadurch bedingt ist eine vollständige Erfassung von MUC1 nicht in allen Fällen möglich (z. B. infolge sterischer Behinderung der Antikörperbindung durch die Kohlenhydrat-Seitenketten).

Die Erfindung hat das Ziel, die bisherigen Nachweismethoden für MUC1 durch mAk zu ergänzen, zu erweitern und zu verbessern.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mAk zur Verfügung zu stellen, die bisher noch nicht erfaßte Epitope von MUC1 erkennen.

Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1, 6, 9 und 10 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Die Hybridzellen werden erfindungsgemäß hergestellt durch

A. Immunisierung von Versuchstieren, in erster Linie von Mäusen, mit nativem MUC1,

B. Isolierung von Lymphozyten aus den Versuchstieren und Immortalisierung der Lymphozyten durch Zellfusion mit geeigneten Myelomzellen bzw. eine andere geeignete Immortalisierungsmethode,

C. Selektion der immortalisierten Zelllinien,

D. Testen der immortalisierten Zelllinien auf die Produktion von Antikörpern gegen MUC1,

E. Klonierung der Zellen aus den Kulturen, die Antikörper gegen das MUC1 produzieren, Vermehrung dieser Zellklone und Gewinnung der von diesen Zellen produzierten spezifischen Antikörper und

F. Ermittlung der Feinspezifität der Antikörper.

Der wesentliche Unterschied zu den bisherigen Herstellungsmethoden besteht darin, daß die Immunisierung mit nativem MUC1 erfolgt. Dadurch werden mAk erhalten, die typische Konformationsepitope erkennen. Als aktivster Zellklon wurde A76-A/C7 erhalten.

Dieser Zellklon hat folgende Eigenschaften:

- er erkennt ein unikales Epitop, und zwar ein konformationsabhängiges Peptidepitop, das erst ab 5 Tandem-Repeats auftritt
- er hat eine hervorragende Gewebs- und Zell-Reaktivität
- er ist paraffingängig und hat nur eine äußerst niedrige unspezifische Bindung,
- die Reaktivität ist unabhängig von der Glykosylierung.

Unikal ist auch der Isotyp IgG1 + IgM, k; die Antikörper-Spezifität der beiden Isotypen ist identisch, wiederholte Klonierungen führen nicht zu Klonen mit nur einem Isotyp.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper als Nachweisreagenzien. Sie können im immunhistologischen Nachweis von Tumoren (z. B. kolorektalen Karzinomen) oder dem Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark bzw. in Lymphknoten vorteilhaft verwendet werden. Dabei wird der Kulturüberstand (konditioniertes Kulturmedium) der betreffenden Hybridzelllinien oder gereinigter Antikörper in geeigneter Verdünnung eingesetzt. Der Test selbst wird nach einer gängigen histologischen Technik an Gefrier- oder Paraffinschnitten durchgeführt, z. B. mittels der sogenannten ABC-Technik.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können gleichermaßen zum immunologischen Nachweis von MUC1 als Tumormarker in Körperflüssigkeiten wie z. B. Blutplasma eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper zur Isolierung und Reinigung von MUC1, z. B. für therapeutische Zwecke (molekulare Tumorstoffen).

Durch die Erfindung wird ermöglicht, den Nachweis von MUC1 exakter als bisher durchzuführen. Der Einsatz der erfindungsgemäßen Antikörper sichert, daß eine immunologische Reaktion definitiv nur mit einem Epitop von MUC1 erfolgt. Dadurch ist eine hohe Spezifität gegeben, und die Ergebnisse mit verschiedenen Proben sind reproduzierbar. Deshalb sind die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper besonders geeignet für die Früherkennung und den Nachweis verschiedener Tumore sowohl auf immunhistologischem wie auf immunologischem Wege.

Anliegend wird der Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert:

Beispiel 1

Monoklonaler Antikörper: A76-A/C7

Spezifität: menschliches epitheliales Mucin (MUC1, PEM, MAM-6, Episialin, EMA)
 Isotyp: IgG1 + IgM (nicht trennbar durch wiederholtes Klonieren), kappa
 Spezies: Maus (Balb/c)
 Immunogen: T-47D-Zellen (Brustkrebszelllinie)
 Fusions-Partner: X63-Ag8.653
 Fusionstyp: PEG
 Hybridzelllinie: A76-A/C7; Medium: RPMI 1640; 10% FCS, 5×10^{-5} M 2-Merkaptoethanol; mycoplasmafrei
 Western blot: Hochmolekulares Mucin ($M_r > 5 \times 10^5$)
 Epitop: Peptidepitop, konformationsabhängig (tritt bei ≥ 5 Tandem-Repeats auf)
 Kreuzreaktivität: keine bekannt
 Histologie: Paraffin- und Gefrierschnitte
 Vorkommen des Antigens in menschlichen Geweben: Lumenale Membran des Brustepithels, Brusttumorzellen, Talgdrüsen, Schweißdrüsen, Pankreasepithel, kolorektale Karzinome u. a.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen epitheliales Mucin (MUC1) mittels klonierter Hybridzellen, die hergestellt werden durch:
 - A. Immunisierung von Versuchstieren, in erster Linie von Mäusen, mit nativem MUC1,
 - B. Isolierung von Lymphozyten aus den Versuchstieren und Immortalisierung der Lymphozyten durch Zellfusion mit geeigneten Myelomzellen bzw. eine andere geeignete Immortalisierungsmethode,
 - C. Selektion der immortalisierten Zelllinien,
 - D. Testen der immortalisierten Zelllinien auf die Produktion von Antikörpern gegen MUC1,
 - E. Klonierung der Zellen aus den Kulturen, die Antikörper gegen das MUC1 produzieren,
 - F. Vermehrung dieser Zellklone und Gewinnung der von diesen Zellen produzierten spezifischen Antikörper und
 - F. Ermittlung der Feinspezifität der Antikörper.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als MUC1-Antigen lebende menschliche Brustkrebszellen (als Zelllinie kultiviert) nach Behandlung mit Neuraminidase eingesetzt werden.
3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Myelomzellen für die Zellfusion vorzugsweise Zellen der Linie X63-Ag8.653 verwendet werden.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellfusion mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die fusionierten Zellen durch ein selektives Kulturmedium isoliert werden.
6. Monoklonale Antikörper gegen MUC1, hergestellt durch Vermehrung und Kultivierung von Hybridomzellklonen, die nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 hergestellt werden.
7. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 6 gegen ein unikales Epitop des MUC1-Moleküls, das nur bei Vorliegen mehrerer "Tandem-Repeats" (≥ 5) auftritt.
8. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 6 und 7, hergestellt durch Vermehrung der Hybridzelllinie A76-A/C7.
9. Hybridzelllinien, hergestellt nach einem oder mehreren der Ansprüche 1–5.
10. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8 als Nachweisreagenzien.
11. Verwendung der monoklonalen Antikörper gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8 zum immunhistologischen Nachweis von Tumoren.
12. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8 zum immunologischen Nachweis von Tumoren.
13. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8 zur Präparation von MUC1.
14. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8 zur Therapie von Karzinomen, insbesondere als adjuvante Therapie, und zwar sowohl als gereinigte Antikörper als auch in Form von Konjugaten oder als Komplexe mit dem Antigen.

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY